

SOCIETE BIOGEMMA

Demande d'autorisation auprès de la Commission d'Etude de
la Dissémination des Produits issus du Génie Biomoléculaire

**Evaluation au champ d'un système de production de
maïs hybrides
(demande pluriannuelle)**

BIOGEMMA S.A.S.
5 rue Saint-Germain l'Auxerrois
75001 PARIS
mars 2002

PREAMBULE

Cette demande d'expérimentation est déposée dans le cadre de la réglementation européenne décrite dans la directive 90/220/CEE, transposée en droit français par la loi du 13 juillet 1992. Cette directive vient d'être modifiée le 21 avril 2001 par la directive 2001/18/CE.

Ces textes régissent la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés, que ce soit à des fins de mise en marché ou à d'autres fins et notamment à des fins de recherche.

La demande qui fait l'objet de ce dossier concerne un essai dont les résultats attendus doivent permettre de valider une hypothèse (« preuve de concept »). Il s'agit d'un premier essai en champ pour l'un des deux événements de transformation ; il fait suite à de nombreuses expérimentations en serre. Il permettra de confirmer, dans les conditions agronomiques normales, le bon fonctionnement du caractère modifié dans plusieurs générations différentes de ces plantes.

Conformément à la directive 2001/18, l'importance de la dissémination et les conditions de son déroulement prennent en compte le stade de développement du projet et l'information scientifique disponible. S'agissant d'un projet nouveau, les plantes ont été caractérisées par des études moléculaires ; la stabilité d'expression des caractères introduits dans les plantes a été observée durant plusieurs générations en serre.

SOMMAIRE

Préambule	2
Introduction	5
A. Informations administratives générales	8
A.1 Nom du notifiant	8
A.2 Qualification et expérience des responsables scientifiques	8
A.3. Titre du projet	8
A.4. Développements ultérieurs envisagés	8
B. Caractéristique biologique de l'espèce végétale réceptrice	8
B.1 Position taxonomique	8
B.2 Mode de reproduction et compatibilité sexuelle avec la flore	9
B.2a Information concernant la reproduction du maïs	9
B.2b Compatibilités sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées	9
B.3 Capacité de survie	9
B.3a Capacité à former des structures de survie ou de dormance	9
B.3b Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie	10
B.4 Dissémination	10
B.5 Distribution géographique de la plante	10
B.6 Description de l'habitat naturel de la plante	10
B.7 Interactions avec des organismes autres que les plantes	10
C. Transformation génétique des plantes	11
C.1 Méthode de transformation	
C.1a. Transformation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
C.1b. Transformation par biolistique	11
C.2 Nature et source des vecteurs utilisés	11
C.3 Taille, origine et fonction voulue de chaque fragment constituant de la région envisagée pour le transfert	11
D. Le matériel transgénique	12
D.1 Traits et caractéristiques introduits	12
D.2 Informations sur les séquences réellement transférées	12
D.3 Informations concernant l'expression de l'insert	12
D.4 Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice	13
D.5 Stabilité génétique des inserts	13
D.6 Possibilité de transfert de matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes	13
D.7 Toxicité ou effet nocif pour la santé publique et l'environnement de la modification apportée	14
D.8 Interactions significative avec des organismes non-cibles	14
D.9 Description des méthodes de détection de d'identification de l'OGM	15
D.10 Historique des précédentes disséminations	15
E. Caractérisation du site de dissémination	15
E.1 Localisation et étendue du site de dissémination	15
E.2 Description de l'écosystème	15
E.3 Espèces végétales cultivées ou apparentées sauvages sexuellement compatibles	15

F. Information concernant la dissémination	16
F.1 Objectif de la dissémination	16
F.2 Date et durée de l'opération	16
F.3 Méthode de dissémination	16
F.4 Préparation du site avant, pendant et après la dissémination	16
F.5 Nombre approximatif de plantes	17
G. Mesures de prévention de dispersion	17
G.1 Précautions prises	17
G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination	17
G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris pour le traitement des déchets	17
G.4 Description des plans et techniques de surveillance	17
G.5 Description des plans d'urgence	18
H. Incidence de la dissémination sur l'environnement	18
H.1 Modification de la persistance ou de la vitesse de propagation dans les habitats agricoles	18
H.2 Avantages ou inconvénients sélectifs conférés par transfert de gènes aux autres espèces sexuellement compatibles	18
H.3 Incidences des interactions avec les organismes non-cibles (absence d'organismes cibles)	18

INTRODUCTION

En 2001, 450 000 agriculteurs ont cultivé en France 3 408 000 hectares de maïs, se répartissant à peu près à égalité entre des productions de maïs grain et de maïs fourrage (ensilage). Pour emblaver ces surfaces, 6 200 000 doses de 50 000 grains ont été utilisées comme semences. La totalité de ces doses était constituée de variétés de maïs hybrides dont les semences sont issues de la fécondation dirigée de lignées femelles par des lignées mâles. En raison des avantages liés à la culture de maïs hybrides (rendement élevé et sécurisé, meilleure qualité des productions, etc), la mise en culture d'autres types génétiques de maïs (populations) n'est qu'anecdotique.

La France est le second pays producteur de semences de maïs derrière les Etats-Unis, exportant largement à travers l'Europe (45 % de sa production). Cette production est assurée par quelques milliers d'agriculteurs - multiplicateurs, sur une surface de près de 51 000 hectares, principalement dans le Sud-Ouest, l'Anjou, le Centre, Rhône-Alpes et l'Auvergne. Economiquement, cette activité fait vivre de nombreux agriculteurs, quelques sociétés semencières et coopératives, et a dégagé, par les seules exportations, un excédent de balance commerciale de près de 170 millions d'euros pour la campagne qui vient de se terminer.

La production nécessite une opération mécanique ou manuelle de castration des plantes pour pouvoir diriger le sens de croisement et obtenir les semences de maïs hybride. Cette opération, rendue difficile en raison d'une main d'œuvre manquante et de plus en plus coûteuse, revient au producteur à environ un millier d'euros par hectare. Des technologies d'utilisation de lignées « mâle-stériles » reposant sur une stérilité d'origine cytoplasmique ont été introduites ; elles permettent de réduire fortement le coût de production des hybrides. Les surfaces de production de semences utilisant cette technologie ont été d'environ 9% en 2001, révélant cependant des problèmes de fiabilité dus à la présence de plantes femelles dites « fluctuantes », c'est-à-dire mâle-fertiles et donc productrices de pollen, entraînant parfois le déclassement de la production par défaut de qualité. Ce phénomène est influencé par les conditions pédo-climatiques et rend difficile le développement de cette technologie.

Dans un contexte général de réduction des coûts, imposé notamment par les règles de la Politique Agricole Commune et des accords internationaux, la baisse des coûts de production des semences s'impose comme une nécessité, découlant de l'effritement du prix de vente des semences. Si la technologie des lignées mâle-stériles d'origine cytoplasmique est une voie possible, elle présente certains inconvénients qui nous amènent à évaluer un autre système, *via* la transgénèse, qui permettrait de fiabiliser et sécuriser les productions d'hybrides.

Notre stratégie a été choisie en considérant le rôle important joué par ces cellules du tapis de l'anthere dans la production de grains de pollen fonctionnels. Le tapis entoure l'anthere (ou sac pollinique) au stade précoce de son développement, il dégénère pendant les stades ultérieurs et se présente sous forme désorganisée dans l'anthere mature. Il semble que les cellules du tapis fournissent des nutriments et des éléments structuraux lors du développement des microspores. D'autres rôles sont attribués à ces cellules notamment la production d'une activité enzymatique (la callase) nécessaire à la libération des grains de pollen. Le rôle important de ces cellules est souligné par le fait que, chez des mutants mâle-stériles de *pétunia*, la stérilité est souvent reliée à un dysfonctionnement de ce type de cellules.

Pour obtenir des plantes de maïs mâle-stériles, nous avons utilisé un gène entraînant la dégradation des ARN dans la cellule et l'avons mis sous le contrôle de régions régulatrices de son fonctionnement à savoir un promoteur végétal dont l'expression est spécifique au tapis de l'anthere et d'un terminateur de transcription. L'expression de ce gène a pour conséquence la dégénérescence et la mort des cellules du tapis de l'anthere. La destruction de ces cellules qui entourent les sacs polliniques empêche alors la formation de grains de pollen fonctionnels et conduit ainsi à une stérilité mâle génique à caractère dominant. L'obtention d'une stérilité mâle génique artificielle par expression d'une protéine dégradant les ARN dans l'anthere a déjà été réalisée par plusieurs auteurs.

La transformation génétique, *via Agrobacterium tumefaciens*, nous a permis d'obtenir dans un premier temps, différents événements de transformation. Après une première phase de screening en serre, l'un de ces événements de transformation s'est montré stable en terme de stérilité (stérilité totale des plantes transformées sur 8 générations, pour différents fonds génétiques testés). Par ailleurs, de par le caractère de stérilité conféré aux plantes porteuses de l'événement, il était impossible d'obtenir par autofécondation cet événement à l'état homozygote.

Malgré l'intérêt que présentent ces lignées mâle-stériles hétérozygotes pour la production d'hybrides (stérilité mâle dominante donc meilleure qualité de production des semences sans nécessité de castration des plantes), ces lignées présentent néanmoins certaines contraintes nécessitant la modification de la conduite culturale :

- nécessité d'un traitement herbicide au champ pour la sélection des plantes femelles stériles (caractère de stérilité associé à la tolérance à un herbicide) : perte de 50 % des plantes par ségrégation mendélienne (une plante sur deux seulement étant porteuse du transgène),
- nécessité de semis à double densité pour compenser la perte des plantes après traitement herbicide,
- hétérogénéité des plantes au champ liée à l'irrégularité de répartition, après traitement herbicide, s'accompagnant d'une hétérogénéité plus grande du calibre des semences,
- légère diminution du rendement probablement associée à l'un ou à la conjugaison de ces différents paramètres.

Une possibilité de s'affranchir de ces inconvénients consiste à obtenir une lignée de plantes femelles où toutes les plantes sont stériles, évitant l'étape de traitement herbicide et ses conséquences en terme de peuplement. C'est pourquoi nous avons pensé à faire appel à un système de maintien de la stérilité, lié à un marqueur phénotypique, pour obtenir des lignées mâle-stériles où toutes les plantes présenteraient ce caractère. Ces lignées pourront alors être utilisées pour la production d'hybrides selon les conditions habituelles (densité normale, absence de traitement herbicide spécial, homogénéité).

Nous avons donc produit par transformation génétique (par biolistique) un événement de transformation, permettant par un système de maintien de stérilité, de produire des plantes femelles où toutes les plantes sont stériles. Ce second événement de transformation associe le caractère de maintien de stérilité à un caractère visible à l'œil nu sur certaines parties de la plante.

L'essai au champ faisant l'objet de la présente demande a pour but de valider ce nouveau système de production de semences hybrides :

- 1- par la production de semences de pré-base,
- 2- par la production de semences de base,
- 3- par la production de semences hybrides via ce système,
- 4- par la production de grain « consommation » à partir de semences hybrides produites selon ce système.

Les semences de pré-base renferment les deux événements de transformation (événement de stérilité mâle et événement de maintien de la stérilité). Les semences de base, les semences hybrides et les grains de type consommation ne renferment que l'événement de transformation conférant la stérilité mâle.

Ces différentes productions sont réalisées uniquement à des fins expérimentales, elles seront accompagnées d'observations phénotypiques et d'analyses des plantes et grains récoltés.

A INFORMATIONS ADMINISTRATIVES GENERALES

A.1 Nom et adresse du notifiant

Le notifiant est :

Société BIOGEMMA S.A.S.
5, rue Saint-Germain l'Auxerrois
75001 PARIS

A.2 Qualification et expérience des responsables scientifiques

L'ensemble de ces responsables et leurs équipes de chercheurs et de techniciens, ont déjà conduit différents essais en champ sur différentes espèces végétales depuis plusieurs années. Ces essais portaient aussi bien sur des caractères de types agronomiques que des caractères relatifs à la qualité de la graine.

A.3 Titre du projet

Evaluation au champ d'un système de production de maïs hybrides.

A.4 Développements ultérieurs envisagés

L'expérimentation au champ est destinée à valider une stratégie de production d'hybrides, incluant ses étapes préalables : production de semences de base et de pré-base, et la production de grain « de type consommation » à partir de l'hybride préparé.

Les événements de transformation présentés dans ce dossier ne sont pas destinés à un développement commercial. Il n'est pas prévu d'autre utilisation pour ce matériel biologique.

B CARACTERISTIQUE BIOLOGIQUE DE L'ESPECE VEGETALE RECEPTRICE

B.1 Position taxonomique

Zea mays ssp. Mays

Nom de famille : Graminae
Genre : *Zea*
Espèce : *mays*
Sous-espèce : *mays*
Nom usuel : maïs

L'origine géographique supposée de cette plante est le Mexique et l'Amérique centrale.

B.2 Mode de reproduction et compatibilité sexuelle avec la flore

B. 2. a) Information concernant la reproduction du maïs

B.2.a).i. Mode de reproduction

Le maïs est une plante monoïque à fleurs mâles et femelles portées sur la même plante mais séparées. Les fleurs mâles, regroupées au sommet de la tige en une inflorescence terminale appelée panicule, ne portent que des étamines entourées de glumelles. Elles apparaissent les premières (phénomène de protandrie). Les fleurs femelles, groupées en un ou plusieurs épis à l'aisselle des feuilles, n'apparaissent que par leurs longs styles appelés « soies » sortant des bractées ou spathes entourant chaque épi. Chaque fleur contient un ovaire unique, chaque épi comprend de 300 à 500 fleurs environ.

B.2.a).ii. Facteurs spécifiques affectant la reproduction

La reproduction de cette plante est assurée par la libération du pollen contenu dans les étamines (organes de la panicule) par ouverture des sacs polliniques ou anthères.

Le mode de reproduction du maïs est dit allogame (pollinisation par une autre plante de maïs) anémophile (pollinisation par le vent). La pollinisation du maïs en condition naturelle se réalise principalement par fécondation croisée (allofécondation supérieure à 95%). Un faible taux d'autofécondation est néanmoins possible (inférieur à 5%).

B.2.a).iii. Temps de génération

Le maïs est une plante à cycle biologique court : le temps de génération du semis à la récolte des grains est d'environ 7 à 8 mois. Le semis, en France, a lieu à partir du mois d'avril et la récolte en octobre - novembre.

B. 2. b) Compatibilités sexuelles avec d'autres espèces sauvages ou cultivées

Il n'y a pas d'hybridation interspécifique possible en France du fait de l'absence d'espèces voisines ou apparentées se développant spontanément sur le territoire français.

B.3 Capacité de survie

B. 3. a) Capacité à former des structures de survie ou de dormance

Le maïs est une plante annuelle qui se reproduit par graine et ne présente pas de moyens de reproduction végétative en condition naturelle. Les semences sont nombreuses mais leur viabilité est fortement limitée. Les semences sont en effet très sensibles aux maladies et au froid. Il n'y a en général pas de repousses à la suite d'une culture de maïs, seuls les épis non battus peuvent permettre au grain de conserver éventuellement une capacité de germination l'année suivante.

B. 3. b) Facteurs spécifiques affectant la capacité de survie

Les graines ne présentent pas de dormance. Les conditions climatiques hivernales de manière générale ne permettent pas la repousse de cette plante. Les pratiques agricoles courantes conduisent également à la destruction des graines.

B.4 Dissémination

La dissémination du maïs peut s'effectuer par l'intermédiaire du pollen et des graines :

- le pollen provenant de l'inflorescence mâle est dispersé par gravité et par le vent. Le début de la libération du pollen a lieu généralement deux ou trois jours avant l'apparition des soies des épis femelles. La durée de floraison des fleurs mâles est de 6 à 10 jours.
- la viabilité des semences est fortement limitée car elles sont sensibles aux maladies et surtout au froid hivernal. C'est pourquoi il n'y a en général pas de repousses de maïs.

B.5 Distribution géographique de la plante

Le maïs est dépendant de l'homme pour sa dispersion géographique. Le maïs est utilisé, soit comme ensilage, soit pour sa production de grains. Il s'agit de la première culture céréalière du monde en terme d'importance. La production française de maïs est localisée principalement dans les régions suivantes :

- Aquitaine et Midi-Pyrénées,
- Façade atlantique et notamment en Poitou-Charentes,
- Est et notamment région Rhône-Alpes et Alsace,
- les zones au nord de la Loire (Centre, Ile-de-France, Picardie, Champagne-Ardenne).

B.6 Description de l'habitat naturel de la plante

Le maïs, originaire d'Amérique centrale, n'a pas d'habitat naturel en Europe. Il ne se développe pas en dessous de 9-10 °C et a une température optimale de croissance de 30 à 33°C. En climat continental (Canada, URSS), le maïs est cultivé jusqu'au 60^{ème} parallèle.

Le maïs est sensible à de nombreux parasites et ravageurs. Les plus importants sont les parasites fongiques (*Fusarium sp*, *Ustilago maydis*, *Sphacelotheca reliana* ...) et les insectes (taupin, pyrale et sésamie).

B.7 Interactions avec des organismes autres que les plantes

Durant sa culture, le maïs peut être en interaction avec des ravageurs présents dans le sol (taupins, vers gris), dans ses propres tissus (pyrales, sésamies) ou à sa surface (pucerons). Il est également en interaction avec des organismes pathogènes, essentiellement des champignons (*Fusarium*, *Helminthosporium*, *Ustilago*, etc).

C TRANSFORMATION GENETIQUE DES PLANTES

C.1 Méthode de transformation

La transformation des plantes de maïs a été obtenue via deux méthodes :

- transformation par *Agrobacterium tumefaciens*,
- transformation par biolistique.

C. 1. a) Transformation par *Agrobacterium tumefaciens*

La transformation par *Agrobacterium tumefaciens* est basée sur les propriétés naturelles de cette bactérie et sur l'utilisation de vecteurs « désarmés ». Des embryons immatures de maïs sont mis en co-culture avec les cellules d'*Agrobacterium*, les embryons sont transférés et cultivés *in vitro* sur un milieu de sélection contenant un herbicide (glufosinate). Les cals qui se développent alors sont constitués de cellules transformées ; des plantes transgéniques sont ensuite régénérées à partir de ces cals.

C. 1. b) Transformation par biolistique

La transformation par biolistique permet l'introduction directe de gènes dans le végétal ; les vecteurs portant les gènes à transférer ont été introduits dans des cals de maïs qui sont ensuite sélectionnés sur un milieu contenant un herbicide (glufosinate). Des plantes transgéniques sont ensuite régénérées à partir de ces cals.

C.2 Nature et source des vecteurs utilisés

Deux types de vecteurs ont été utilisés selon le mode de transformation : des vecteurs appelés binaires dans le cas de la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, des vecteurs de type pUC pour la transformation par biolistique.

C.3 Taille, origine et fonction voulue de chaque fragment constituant de la région envisagée pour le transfert

C. 3. a) Événement de transformation mâle stérile

La région envisagée pour le transfert est constituée d'un gène bloquant la formation du grain de pollen, associé à un gène marqueur qui confère la résistance à un herbicide dans les cellules transformées et permet de sélectionner les plantes transformées lors des étapes de culture *in vitro*.

C. 3. b) Événement de transformation mainteneur de la stérilité lié à un caractère visuellement repérable

La région envisagée pour le transfert comprend un gène restaurant la formation du grain de pollen, associé à deux gènes du maïs (dans une configuration antisens destinée à inhiber l'expression des mêmes gènes endogènes chez le maïs) ainsi qu'un gène marqueur des résistance à un herbicide qui permet de sélectionner les plantes transformées lors des étapes de culture *in vitro*.

Des informations précises ont été fournies aux experts chargés de l'évaluation de ce dossier. Elles ne figurent pas ici afin de préserver la protection industrielle de ces données.

D LE MATERIEL VEGETAL TRANSGENIQUE

D.1 Traits et caractéristiques introduits

D. 1. a) Lignée femelle mâle-stérile

Cette lignée femelle hétérozygote porte une stérilité mâle génique artificielle liée à la tolérance au glufosinate ammonium (herbicides Basta® et Liberty®). Cette ligne ne présente pas de caractères phénotypiques différents de la lignée d'origine non transformée autres que la tolérance au glufosinate ammonium et une stérilité mâle complète (absence de grain de pollen dans les anthères et absence de sortie des anthères).

D. 1. b) Lignée mainteneuse de stérilité liée à un caractère visuellement repérable

Cette lignée se distingue phénotypiquement de la même lignée non transformée par la tolérance au glufosinate et par une caractéristique particulière visible à l'œil nu sur certains organes et découlant de l'inhibition de fonctionnement des deux gènes de maïs. Elle permet de multiplier la lignée mâle-stérile, qui ne produisant pas de pollen, ne peut pas s'autoféconder et produire une descendance sans l'aide du pollen de la lignée mainteneuse.

D.2 Informations sur les séquences réellement transférées

Les résultats des analyses moléculaires (analyses de type Southern portant sur l'ADN des plantes transformées) des deux lignées utilisées : lignée femelle mâle-stérile et lignée mainteneuse de stérilité ont présentés aux experts chargés de l'évaluation de ce dossier.

Ces résultats ont également permis de montrer que les gènes à transférer ont été intégrés dans le génome de la plante d'une façon stable.

D.3 Informations concernant l'expression de l'insert

L'expression des gènes de l'insert pour l'événement mâle-stérile peut être mise en évidence par analyse moléculaire ou biochimique ainsi que par l'observation du phénotype de tolérance au glufosinate associée à une stérilité mâle génique dominante.

L'expression des gènes de l'insert pour l'événement mainteneur de stérilité peut être mis en évidence par analyse moléculaire ou biochimique et par l'observation du phénotype de tolérance au glufosinate liée à une caractéristique particulière visible à l'œil nu sur certains organes de la plante.

D.4 Description des différences entre la plante supérieure génétiquement modifiée et la plante réceptrice

D. 4. a) Mode / vitesse de reproduction

Le maïs est essentiellement allogame, la fécondation étant assurée par le pollen d'une plante à une autre par le vent. La modification essentielle des plantes mâle-stérile rend ces plantes transgéniques allogames strictes c'est à dire incapables de s'autoféconder et de polliniser d'autres plantes.

Les plantes dont la fertilité est restaurée (lignée mainteneuse), cultivées en serre n'ont pas montré de différence quant à la reproduction par rapport à la lignée d'origine non transformée.

D. 4. b) Dissémination

La capacité de dissémination via le pollen des plantes transformées mâle-stériles est annulée puisqu'elles ne produisent plus de pollen : elles sont donc incapables de s'autoféconder ou de féconder d'autres plantes de maïs.

Hormis les caractères introduits : résistance au glufosinate et absence de pollen, nous n'avons pas observé d'autres modifications par rapport à la lignée d'origine (précocité, morphologie de l'épi...).

Les plantes de la lignée mainteneuse produisent du pollen et sont fertiles. Leur panicule sera ensachée pendant la durée de la floraison et les risques de dissémination accidentelle *via* le pollen transgénique sont très fortement réduits.

D. 4. c) Capacité de survie

Cette capacité ne semble pas devoir être affectée : la résistance au glufosinate, conférée aux plantes génétiquement modifiées, ne présente pas d'avantage sélectif en dehors des pressions de sélection induites par l'application de l'herbicide. Or cet herbicide n'est pas utilisé sur les cultures de maïs, les plantes faisant l'objet de ce dossier ne présenteront donc pas d'avantage par rapport aux variétés conventionnelles.

D.5 Stabilité génétique des inserts

De nombreuses analyses moléculaires et génétiques des plantes transformées obtenues par la technique de transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ou par biolistique ont montré que l'intégration des transgènes se fait dans le génome nucléaire de la plante. Dans les plantes qui font l'objet de ce dossier, les transgènes présentent une expression et une héritabilité stables de type mendélien. Cette stabilité d'insertion et d'expression a été observée sur plusieurs générations de plantes cultivées en serre.

D.6 Possibilité de transfert de matériel génétique des plantes génétiquement modifiées dans d'autres organismes

Les études menées jusqu'à présent n'ont pas permis de mettre en évidence un transfert de gène dans la nature entre bactéries et eucaryotes. En ce qui concerne le transfert horizontal, aucune donnée ne laisse supposer que les transgènes puissent avoir un comportement différent

d'un gène endogène pour les plantes cultivées au champ. Des informations supplémentaires sont disponibles sur le site <http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/gmo/index.html>.

Les transferts interspécifiques et intergénériques ne sont pas possibles dans le cas du maïs cultivé en France car aucun genre et aucune espèce ne peuvent être fécondés par le pollen de maïs.

L'ensachage des panicules de plantes transgéniques durant la période de production de pollen réduira très fortement le risque de dissémination accidentelle vers d'autres cultures *via* le pollen.

D.7 Toxicité ou effet nocif pour la santé publique et l'environnement de la modification apportée

La modification génétique confère aux plantes transgéniques décrites dans ce dossier la résistance au glufosinate (herbicides Basta[®] et Liberty[®]) ainsi qu'un phénotype stérilité mâle génique artificielle ou de restauration de fertilité. Les deux gènes introduits responsables de ces caractères ne présentent pas de risque de toxicité particulier.

Une étude a montré que la phosphinotricine acetyltransférase, enzyme produite à partir du gène marqueur qui a été introduit et détoxifiant la phosphinotricine ou glufosinate (principe actif de l'herbicide Basta[®]), est dégradée en quelques secondes par les sucs gastriques humains. Cette protéine, exprimée de façon constitutive dans les plantes, ne semble donc pas pouvoir entraîner de réponse allergique après ingestion.

Chez la lignée mâle-stérile, la production de la protéine dégradant les ARN conduit très rapidement à la mort des cellules qui la produisent, si bien que la production de protéine est trop faible pour être indétectable. Aucune donnée ne fait état de son éventuelle toxicité. Aucun risque n'est attendu par rapport à l'ingestion éventuelle de tout ou partie de la panicule des plantes transgéniques.

Chez la lignée mainteneuse, les séquences introduites en antisens vont permettre l'inhibition des gènes endogènes du maïs : il n'y a pas de synthèse de protéine nouvelle dans les tiges, feuilles ou grains. Une protéine restaurant la formation du grain de pollen est produite dans cet organe. Elle n'est pas connue pour présenter de toxicité. Aucun risque n'est attendu par rapport à l'ingestion éventuelle de tout ou partie de la panicule des plantes transgéniques.

A ce jour nous ne disposons d'aucune indication pouvant laisser supposer une toxicité éventuelle des séquences introduites.

D.8 Interactions significatives avec des organismes non cibles

Aucune interaction particulière n'est attendue avec les organismes non cibles. La protéine phosphinotricine acetyltransférase n'est pas connue pour présenter de toxicité. Aucun risque n'est attendu suite à l'ingestion de parties de plante de cet essai par d'éventuels animaux sur les sites de culture.

D.9 Description des méthodes de détection et d'identification de l'OGM

Les plantes transgéniques retenues pour cet essai sont identifiables par leur phénotype de résistance au glufosinate (résistance aux herbicides Basta[®] et Liberty[®]).

Des techniques moléculaires peuvent également être utilisées telles que la technique Southern ou l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des séquences introduites.

D.10 Historique des précédentes disséminations

L'événement de transformation de stérilité mâle faisant l'objet de cette demande d'essais en champ multilocaux a déjà été évalué en champ. L'événement de transformation mainteneur de stérilité n'a jamais fait l'objet de dissémination.

E CARACTERISATION DU SITE DE DISSEMINATION

E.1 Localisation et étendue du site de dissémination

Les sites de dissémination pour l'année 2002 se situent dans la région Auvergne et dans la région Midi-Pyrénées.

Les noms des communes où auront lieu ces essais seront fournis dans les Fiches d'Information du Public.

Chaque essai devrait couvrir une surface d'environ 1000 m² dont 500 m² seraient occupés par des plantes transgéniques.

E.2 Description de l'écosystème

Les agrosystèmes concernés par l'expérimentation sont dédiés à la polyculture (céréales à paille, tournesol, maïs, pois...).

Les parcelles utilisées pour la mise en place de ces essais ne sont pas nécessairement isolées d'autres cultures de maïs. Les plantes transgéniques étant soit stériles, soit castrées soit ayant leur panicule ensachée, aucune dissémination de pollen transgénique n'est à prévoir vers d'autres espaces de culture.

Aucune zone protégée n'est située à proximité des lieux d'expérimentation.

E.3 Espèces végétales cultivées ou apparentées sauvages sexuellement compatibles

Aucune espèce sexuellement compatible avec le maïs n'est présente à proximité des différents sites de dissémination. Aucun risque de dissémination de la modification génétique n'est attendu par hybridation interspécifique.

Des champs de maïs peuvent être présents à proximité des sites d'expérimentation. Cependant, les plantes porteuses de la modification génétique étant stériles ou ayant leur panicule ensachée, aucun isolement n'est proposé pour ce type d'expérimentation en raison des risques extrêmement réduits de pollinisation.

F INFORMATION CONCERNANT LA DISSEMINATION

F.1 Objectif de la dissémination

L'objectif de la dissémination est d'évaluer les différentes étapes de la production de semences de maïs hybride ainsi que la production de grains à partir des hybrides expérimentaux produits.

A partir des plantes transgéniques qui ont précédemment été décrites dans ce dossier, quatre types différents d'expérimentations seront réalisées :

- production de semences de pré-base,
- production de semences de base,
- production de semences hybrides,
- production de grain de type « consommation » à partir des semences hybrides.

Toutes les expérimentations sont effectuées à des fins de recherche et de développement.

F.2 Date et durée de l'opération

Pour la campagne 2002, les essais sont prévus d'avril à novembre 2002.

Les autres campagnes se dérouleront d'avril à novembre 2003, 2004 et 2005.

Les semis seront effectués entre mi-avril et fin mai, les récoltes de fin octobre à mi-novembre environ. Ces dates sont indicatives et peuvent être modifiées en fonction des conditions climatiques locales.

F.3 Méthode de dissémination

Les semis seront effectués manuellement ou à l'aide d'un semoir mécanique.

F.4 Préparation du site avant, pendant et après la dissémination

La préparation du sol sera effectuée selon les pratiques agricoles courantes. Après un labour et une préparation du lit de semis, les traitements du sol seront réduits aux traitements herbicides (par un herbicide homologué sur cette culture), insecticides ou anti-limaces sur les sites d'expérimentations.

Les traitements en cours de culture seront adaptés au type d'expérimentation. Un désherbage chimique ou manuel pourra être appliqué selon les besoins.

La récolte des épis sera soit manuelle soit mécanique. Ces épis seront rapatriés en laboratoire où les graines seront conservées jusqu'à leur semis ou analyse.

Les résidus végétaux (épis non récoltés, tiges et feuilles) seront broyés sur place mécaniquement. Les résidus broyés seront ensuite enfouis par un travail superficiel du sol. Un labour d'hiver sera ensuite effectué. Aucune culture commerciale de maïs ne sera implantée sur les parcelles d'essai l'année suivante ; les éventuelles repousses de maïs seront détruites avant floraison.

F.5 Nombre approximatif de plantes

Le nombre approximatif de plantes transgéniques sur chaque site sera d'environ 3000.

G MESURES DE PREVENTION DE DISPERSION

G.1 Précautions prises

G. 1. a) Distance d'isolement des autres espèces sexuellement compatibles

Etant donné le caractère de stérilité mâle exprimé dans les plantes transgéniques et la pratique d'ensachage des panicules (semences de pré-base), aucun isolement n'est proposé pour l'ensemble de ces essais.

G. 1. b) Mesures minimisant la dissémination du pollen et des graines

Le risque de dissémination de pollen transgénique est extrêmement réduit puisque les plantes ici produites sont porteuses d'une stérilité mâle génique artificielle ou auront leur panicule ensachée.

Après semis, le surplus éventuel de graines est récupéré et rapatrié au laboratoire pour destruction. Ces précautions réduisent les risques de dissémination des graines en dehors de la parcelle d'expérimentation.

G.2 Description des méthodes de traitement du site après dissémination

Les épis des plantes transgéniques ou non transgéniques seront récoltés manuellement ou mécaniquement.

Après la récolte, les résidus de plantes (tiges, feuilles) seront détruits par broyage et les restes seront enfouis sur la parcelle.

Les parcelles feront l'objet d'une surveillance régulière l'année suivant l'essai afin d'éliminer toute repousse éventuelle de maïs avant floraison.

G.3 Description des méthodes de traitement après dissémination pour le matériel issu de plantes génétiquement modifiées, y compris pour le traitement des déchets

Le produit des récoltes (graines) sera transféré dans un laboratoire. Les semences seront stockées puis utilisées pour les semis ultérieurs en champ (campagnes 2003, 2004 et 2005) ou en serre ainsi que pour différentes analyses.

G.4 Description des plans et techniques de surveillance

Pendant la culture, l'essai sera suivi très régulièrement par le personnel responsable de la dissémination. La conformité de l'expérimentation aux conditions décrites dans ce dossier et dans l'autorisation du Ministère de l'Agriculture sera contrôlée par des agents assermentés des services de la Protection des Végétaux.

Après la destruction de l'essai, plusieurs visites seront effectuées et plus particulièrement au printemps pendant la période de germination des graines. Les éventuelles repousses de maïs seront éliminées avant la floraison.

G.5 Description des plans d'urgence

Ces essais pourront être arrêtés en cas d'urgence (accident climatique majeur, vandalisme...). Les méthodes de destruction volontaire seront adaptées au stade de développement des plantes (traitement herbicide, broyage éventuellement après récolte des débris dispersés...). Elles seront appliquées dès que possible après la fin des constatations d'usage en pareil cas (huissier, experts, gendarmes...). Durant la période entre le déclenchement de la procédure d'urgence et sa réalisation, l'essai fera l'objet d'une surveillance étroite.

H INCIDENCE DE LA DISSEMINATION SUR L'ENVIRONNEMENT

H.1 Modification de la persistance ou de la vitesse de propagation dans les habitats agricoles

La modification introduite dans les plantes de maïs (tolérance au glufosinate et stérilité mâle ou restauration de fertilité) n'est pas de nature à affecter la persistance des plantes dans l'environnement. Au contraire, le caractère mâle-stérile associée aux plantes porteuses de la modification génétique affecte la capacité des plantes à se reproduire (absence de pollen) et donc à persister dans l'environnement. Excepté l'absence de pollen chez les plantes mâle-stérile, aucune modification du cycle végétatif et reproductif n'a été observée en serre ou en champ.

Le produit utilisé pour la sélection des plantes transformées en serre ou en champ, la phosphinothricine ou glufosinate, herbicide total, ne sera pas pulvérisé sur les parcelles expérimentales.

H.2 Avantages ou inconvénients sélectifs conférés par transfert de gènes aux autres espèces sexuellement compatibles

La seule espèce sexuellement compatible en Europe est le maïs. Le transfert de matériel génétique *via* le pollen vers d'autres cultures de la même espèce sera hautement improbable étant donné le caractère mâle-stérile des plantes ou l'ensachage des panicules et l'absence d'espèces apparentées. De plus, la culture du maïs dans les agrosystèmes à partir de semences hybrides produites selon un cahier de charges rigoureux, la non-utilisation de « semences de ferme » rendent les possibilités d'obtenir des plantes descendantes d'inter-croisement suite à un flux pollinique très hautement improbable. De plus, aucun avantage ou inconvénient sélectif n'est attendu si un tel transfert se produisait.

H.3 Incidences des interactions avec les organismes non cibles (absence d'organismes cibles)

Les plantes faisant l'objet de ce dossier n'ont pas vocation à agir directement sur des organismes cibles. Aucune interaction particulière n'est prévisible au cours de ces essais. L'incidence écologique de ces essais peut être considérée comme minime.